

Tartu Ülikool
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut
Botaanika õppetool

Adele Puusalu

**Fenotüüp *versus* DNA ja proteoomika dermatofüütide
identifitseerimisel kliinilise labori praktikas**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Helle Järv, MSc

Kaitsmisele lubatud

Juhendaja

allkiri, kuupäev

2013

Sisukord

Sissejuhatus	3
1. Sugukond <i>Artodermataceae</i> ja selle tähtsus meditsiinis	4
2. Dermatofüütide poolt põhjustatud haigused	6
2.1 Kõunte seenhaigus ehk onühhomükoos <i>tinea unguium</i>	6
2.2 Naha seenhaigused keha erinevates piirkondades	8
2.3 Peanaha ja juuste seenhaigus	9
3. Traditsioonilised diagnostikameetodid	11
4. Dermatofüütide identifitseerimine MALDI-TOF mass-spektromeetriga	16
5. Polümeraas ahelreaktsioonil põhinevad dermatofüütia diagnostika meetodid	19
5.1 DNA eraldamine	20
5.2 DNA amplifikatsiooniks vajalikud praimerid.....	22
5.3 Ahelreaktsioon, selleks vajalikud tingimused ja edasiarendused	24
5.4 PCR tulemuste analüüs	27
5.5 DNA-põhiste ja MALDI TOF spektomeetrial põhinevate identifitseerimismeetodite plussid ja miinused.....	28
6. Kokkuvõte	31
Summary.....	32
Tänuavaldus.....	33
Kasutatud kirjandus	34
LISA	38

Sissejuhatus

Dermatofüüdid on laialt levinud ja põhjustavad väga sageli haigusi, näiteks küünte seenhaigusesse on nakatunud kuni 20% elanikkonnast. Tegemist on ühe paremini uuritud seenerühmaga, praeguseks on sekveneeritud viie inimpatogeense seene genoomid. DNA nukleotiidsel järjestusel ja proteoomil (organismile omane RNA ja valkude kogum) põhinev mikroorganismide, sealhulgas seente identifitseerimine on muutunud üldiselt aktsepteeritavaks nii fülogeneesi selgitamiseks kui kliinilises laboripraktikas. Meditsiinis oluliste seenerühmade puhul on 4-5 aasta jooksul lisandunud märkimisväärselt meetodeid rutiinse laboratoorse diagnostika parandamiseks, eelkõige seeneliikide korrektseks identifitseerimiseks. Siiski on enamikel juhtudel tegemist nn '*in house*' meetoditega, mida ei ole standardiseeritud ning laiemalt praktikas kasutatud. Suurimad raskused, nagu seene DNA eraldamine kliinilisest materjalist, on DNA põhineva diagnostika puhul ületatud ja Rahvusvahelise Inim- ja Veterinaarmükoloogia Ühingu (*International Society of Human and Animal Mycology* e ISHAM) juurde on loodud spetsiaalne töögrupp dermatofüütide DNA-põhiste diagnostikameetodite osas konsensuse saavutamiseks (Jensen & Arendrup 2012). Mass spektromeetria on mikrobioloogias tekitanud revolutsiooni, olles kiire ja usaldusväärne meetod mikroobide identifitseerimiseks. Dermatofüütide mass-spektrite esimene andmebaas loodi alles 2011.aastal (Theel et al 2011). Oluliselt täiendati andmebaasi 2013.aastal, lisades mõnede kliinilises praktikas oluliste liikide massi spektrite liigisisese varieeruvuse andmeid (Nenoff et al 2013).

Käesoleva töö eesmärgiks on anda ülevaade molekulaarsetest DNA- põhistest ja proteoomi-põhistest liikide tuvastamise meetoditest ning võrrelda neid fenotüüblise liigi määramise kui seni veel laboripraktika „kuldse standardiga“. Lisaks tuua välja erinevad plussid ja miinused seni arendatud ja rakendatud tehnoloogiate puhul ning anda ülevaade hetkeseisust dermatofüütide diagnostika arengus.

1. Sugukond *Artodermataceae* ja selle tähtsus meditsiinis

Sugukonda *Artodermataceae* kuulub kolm dermatofüütide perekonda *Trichophyton*, *Microsporum* ja *Epidermophyton*. Dermatofüüte on ligikaudu 40 liiki, kellest sagedasemaid patogeene on 10 liiki. Dermatofüütid jagunevad vastavalt nende levikukeskkonnale antropofiilseteks, zoofiilseteks ja geofiilseteks (Richardson & Warnock 1997). Dermatofüüdid on ühed enimuuritud organismid biomeditsiinis, kuid hoolimata sellest pole saavutatud stabiilsust taksonoomias. Rahuldavalt on suudetud identifitseerida vaid 25 liiki (Gräser et al 2008). Antropofiilsed dermatofüüdid põhjustavad infektsioone inimestel ja zoofiilsed dermatofüüdid loomadel. Geofiilsed dermatofüüdid elavad pinnases loomadelt pärineval keratiini sisaldaval ainel. Kõigi kolme rühma esindajad on võimelised põhjustama inimestel infektsioone, vaatamata oma looduslikule niššile (Gräser et al 1999). Sugukonna taksonoomiat käsitletakse lähemalt seoses morfoloogilise ja molekulaarsete tunnuste kasutamisega liikide määramisel peatükis 4.

Patogeense liigi määramine aitab määrata ka võimalikku nakatumise allikat ning võib omada prognostilist tähendust. Antropofiilsed dermatofüüdid tekitavad raskesti ravitavat kroonilise kuluga infektsiooni. Zoofiilsed ja geofiilsed dermatofüüdid tekitavad ravile hästi alluvat või iseparanevat põletikulist reaktsiooni (Lutsar et al 2007). Loomadelt pärineva infektsiooni korral on tavaliselt olemas teatavale seeneliigile tüüpiline loom, kellelt infektsioon kandub inimesele. Näiteks *T. verrucosum* kandub üle veiselt, *M. canis* kassidelt ja koertelt, *T. mentagrophytes* näiteks merisigadelt ja harvaesinev *T. equinum* hobustelt. Haiguspilt võib inimesel täiesti erineda looma omast – *T. mentagrophytes* võib põhjustada närilistel vaid kerge ketenduse, kuid inimese nahal ägeda mädase põletiku (Hannuksela et al 2003). Dermatofüüdid kuuluvad haigusi tekitavate organismide hulka, kes nakatavad peaegu iga inimest nende eluaja jooksul. Seetõttu kulub ülemaailmselt ligikaudu 500 miljonit dollarit aastas dermatofüütidevastastele ravimitele (Gräser et al 2008). Vaatamata sellele, et mükoosid ei kuulu registreeritavate haiguste hulka, on paljud uurijad seisukohal, et seenhaiguste esinemissageduse märgatav tõus algas XX sajandil 80-datel aastatel ning see jätkub. Mükooside sageduse tõus on seotud meditsiini edusammudega – populatsioonis suureneb pidevalt isikute osakaal, kelle vastupanuvõime on madal ning kes ilma kaasaegse meditsiini jõupingutusteta oleksid varem meie hulgast lahkunud. Teiseks oluliseks seenhaiguste esinemissageduse tõusu põhjustajaks loetakse XX sajandi lõpus HIV nakkust, sest seened põhjustavad infektsioone eelkõige langenud vastupanuvõimega inimestel (Lutsar et al 2007). Arvatakse, et dermatofüütide plahvatuslik levik 20. sajandil on seotud rahvastiku

linnastumisega. Ravi määramisel on oluline teha vahet, millise dermatofüüdi perekonna esindaja põhjustas nakatumist, näiteks *Epidermophyton* ja *Trichophyton* perekondade liigid on oluliselt tundlikumad ravimi Terbinafine suhtes kui perekonna *Microsporum* liigid. Täpne diagnoos võimaldab ära hoida mittevajalike ravimite tarbimise ning ravimi poolt tekitatud võimalikud kõrvalmõjud (Brillowska-Dabrowska et al 2007). Kuna dermatofüütiasse nakatumine sageneb, ning ravi on pikaajaline ja kulukas, siis on väga oluline, et leitaks võimalikult efektiivne diagnoosimise viis.

2. Dermatofüütide poolt põhjustatud haigused

Dermatofüütideks nimetatakse seeni, mis parasiteerivad inimese ja loomade keratiniseerunud kudedel, põhjustades erinevaid seenhaiguste vorme. Dermatofüütia võib kliiniliselt väljenduda erinevalt, sõltudes infektsiooni asukohast, patsiendi immunoloogilise reaktsiooni ulatusest ja patogeeni liigist (Richardson & Warnock 1997). Keratiniseerunud kudede, nagu nahk, juuksed ja küüned, seeninfektsioonide põhjustajateks inimesel ja loomadel on dermatofüüdid. Nende seente paljunemine nimetatud kudedes põhjustab dermatomükoosi ehk dermatofütoosi. Keratiniseerunud kudede infektsiooniga võib kaasneda erineva tugevusega immuunvastus, mis on seotud naha sügavamate kihtide reaktsiooniga seene invasioonile. Dermatofüütide poolt tekitatud kliinilise pildi kirjeldamiseks kasutatakse terminit „*tinea*“, mis ladina keeles tähendab ussi või koid. Termin kirjeldab tsoneeritud või ringikujulist haiguskollet, mis meenutab naha alla kaevunud ussi. Dermatofüütia korral on tegemist parasiidi (dermatofüüt) ja peremehe (nakatanu) vahelise delikaatse tasakaalustatud olukorraga. Parasitism on kujunenud evolutsiooni käigus ja parasiit muutunud üha spetsialiseerunumaks, koloneerides ainult teatud kudesid. Epidemioloogilistest uuringutest lähtub, et dermatofüütia on üks kõige tavalisemaid inimesi tabavatest haigustest (Lutsar et al 2007). Inimesel võib dermatofüütia klassifitseerida infektsiooni lokaliseerimise järgi, levinumad vormid on peanaha, käte, jalgade ning küünte seenhaigus (Richardson & Warnock 1997). Infektsiooni võib saada kokkupuutel koniidi või seenehüüfiga, juba nakatunud inimeselt või infektsiooni piirkonnast eraldunud nahatükkide kokkupuutel, näiteks ühiskasutavades ruumides paljajalu kõndides. Dermatofüüdid on väliskeskkonnas väga vastupidavad, taluvad kõrgeid temperatuure, UV-kiirgust ja kuivust, kuna moodustavad klonaalseks paljunemiseks paksuseinalisi artrokoniide. Nakkused on kroonilise iseloomuga, nakatunud inimene võib aastakümneid olla nakkusohtlik (Murray et al 2009)

2.1 Küünte seenhaigus ehk onühhomükoos *tinea unguium*

Onühhomükoosiks nimetatakse küünte infektsiooni, mis on põhjustatud dermatofüütide, pärmseente või hallitusseente poolt (Ebihara et al 2009). Varbaküünte nakatumine on levinum võrreldes sõrmeküünte haigestumisega. Varbaküünte haigestumisele eelneb tavaliselt jalgade seenhaigus, samas kui sõrmeküünte nakatumisele eelneb käe, kehanaha või peanaha seenhaigus. Nakkusest võib olla haaratud ainult üks, enamasti aga mitu küünt. Küünte seenhaigusel eristatakse järgmisi vorme: distaalne, lateraalne küünte seenhaigus, pindmine küüneplaadi seenhaigus ja täielik küüne düstroofia. Kõige sagedasemad on distaalne ja

lateraalne küünte seenhaigus. Muutused ilmnevad esmalt küüneplaadi vabaserva ja nurkade piirkonnas, hiljem kogu küüneplaadi ulatuses. Küüneplaat kaotab iseloomuliku läike, muutub kollakaks, tuhmiks ning kergesti murduvaks.

Suurbritannias tekitavad küünte seenhaiguse 85-90% juhtudest dermatofüüdid, kõige sagedasemaks tekitajaks on ülemaailmselt liik *Trichophyton rubrum*. Enne ravi alustamist peab kliiniline diagnoos leidma kinnitust ka laboratoorsel uuringul, et välistada mitte-seenhaigused ning määratleda segainfektsioonide esinemine (Richardson & Warnock 1997). Mitmed mittedermaatofüütide hulka kuuluvad kottseened nagu *Scopulariopsis brevicaulis*, *Scytalidium dimidiatum*, *S. hyalinum* esinevad sageli. Nendest organismidest *S.brevicaulis* ja *S. dimidiatum* on kindlasti küünte patogeeneid, see tähendab need on võimelised keratiini lagundama. Pärmseened perekonnast *Candida* on samuti küünte infektsioonide põhjustajateks. Küüntest isoleeritakse külvis sageli ka teiste kottseente perekondade (*Aspergillus*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*) esindajaid, kuid kuna nad on sapotroofid, siis võivad nad lihtsalt paikneda juba surnud koel (Murray et al 2009). Lisaks peab enne lõpliku diagnoosi välistama haigused, nagu psoriaas, *lichen planus*, küünevalli vähk, mis võivad tekitada sarnaseid sümptomeid dermatofüütidele (Wisselink et al 2011). Mitmed hallitusseened nagu *Acremonium*, *Aspergillus* ja *Fusarium* võivad põhjustada küünte infektsiooni, tungides küünte mehaanilise vigastuse tagajärjel (trauma). Nende seente, kui haigusetehtajate kinnitamiseks, on vajalik koosisene leid mikroskoopiaal (küünes on näha seenehüüfid, koniidikandjad, eosed või muud iseloomulikud struktuurielemendid) ja korduv suure kolooniaarvuga (> 10 kolooniat) isoleerimine külvis, haiguskoolest võetud algmaterjalist. (Mers & Hay 2005). Üldiselt esinevad mainitud seened kontaminantidena sageli eakate inimeste varbaküütel (Hannuksela et al 2003).

Küünte seenhaiguste tekitajate, nende leviku, kliiniliste sümptomite ja kaasnevate haiguste selgitamiseks viidi aastatel 1997-1998 Euroopa riikides (16) läbi nii nimetatud Achilles-projekt, mille käigus uuriti 90 000 inimest. Uurimuse käigus selgus, et meestel esineb jalaseent tihedamini kui naistel ning mida vanemad olid patsiendid, seda sagedamini esines neil jalgade seenhaigust. Näiteks vanuses 70-75 aastaste mees- kui naispatsientide hulgas esines jalaseent 73.9% uuritavatest. Perekond *Trichophyton* liikide poolt oli põhjustatud 75.1%, perekonna *Candida* liikide poolt 11.8% ja perekonna *Aspergillus* poolt 5.9% haigusjuhtudest (Burzykowski et al 2003).

2.2 Naha seenhaigused keha erinevates piirkondades

Naha seenhaiguste puhul suudavad dermatofüüdid tungida enamasti vaid naha välimisse kihti ehk epidermisesse, harvemini on invasioonist haaratud ka pärisnahk (Murray et al 2009; Richardson & Warnock 1997). Kehanaha seenhaigus võib haarata ükskõik millist piirkonda, kuid levinum on see katmata kehaosadel. Sõltuvalt tekitajast on seen võimeline kutsuma esile ägedat põletikulist reaktsiooni. Kui tegemist on zoofiilse dermatofüüdi nakkusega, võib kolle olla kogu ulatuses põletikuline ja kaetud mädaste villikestega. Nahaaluse koe mükoose põhjustavatel seentel on madal virulentsuspotsiaal ning enamasti on need seotud traumaatilise inokulatsiooniga (Lutsar et al 2007). Haiguskolle on ringikujuline, ketendav ja teravalt piiritletud servaga. Põhiliseks sümptomiks on sügelemine. Nahk on tavaliselt kuiv ja kestendab ning vahepeal tekivad infektsioonipiirkonda lõhed. Haiguse selles staadiumis suureneb ka tõenäosus infektsioonipiirkonna nakatumiseks bakteritega (Mims et al 2004).

Kehanaha seenhaigus e *tinea corporis* on dermatofüüdi infektsioon kehatüvel (rinnal, seljal), käsivartel ja säärtel. Kehanaha seenhaigust võib põhjustada liik *Epidermophyton floccosum*, samuti paljud perekondade *Trichophyton* ja *Microsporum* esindajad, nagu näiteks *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* ja *T. tonsurans* (Richardson & Warnock 1997; Hannuksela et al 2003). Antropofiilsetest liikidest nagu *E. floccosum* ja *T. rubrum* põhjustatud infektsiooni puhul on tavaline, et patsient ise kannab nakkust algkoldest edasi, näiteks jalgadelt teistele kehaosadele. Tüüpilisel juhul saadakse kehanaha seenhaigus nakatunud lemmikloomadelt, aga ka kokkupuutel nakatanud kodu-, metsloomade või pinnasega. Laialt levinud tekitajaks on kasside ja koerte kaudu leviv *M. canis*, põllumajanduspiirkondades ka veiste ja hobuste vahendusel leviv *T. verrucosum*.

Kubemepiirkonna naha seenhaigus e *tinea cruris* on dermatofüüdi infektsioon kubemes ja perianaalpiirkonna nahal. Tavaliselt on kolded kahepoolsed, reite siseküljel või tuharatel, ulatudes kuni vööjooneni. Nakkus võib reite siseküljelt levida peenisele, skrootumile, tuharavoltidele, samuti reite ees- ja tagakülgedele. Kolded on teravalt piiritletud, punetavad või kollakaspruunid ning kiiresti levivad. Kubemepiirkonna naha seenhaigus on enim levinud meestel vanuses 18-25 ja 40-50 (Richardson & Warnock 1997). Kubemeseent tekitavad tavaliselt *T. rubrum* või *T. mentagrophytes*, harva *E. floccosum* (Hannuksela et al 2007).

Jalgade seenhaigus e *tinea pedis* on dermatofüüdi infektsioon jalgadel, tavaliselt varvaste vahel, kroonilisel juhul kogu tallal ja jala külgedel. Peamised patogeenid Euroopas ja Põhja-Ameerikas on *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* ja *E. floccosum*. Tavaliselt saab nakkus alguse

seeneostega saastunud põrandal paljajalu käimisest. Dermatofüütide hüüfid ja antropoorid säilivad nahakettudel elusana kauem kui 12 kuud. Jalgade seenhaigus on laialt levinud ja nakatumine näib üha sagedasemat. Aastatel 1999-2000 võeti Jaapanis uurimise alla 21 820 patsienti, kellest jalgade seenhaigusesse nakatunuid oli 40% ning 2006 aastal 7783 patsienti, kellest nakatunuid oli 49.4% (Watanabe et al 2010). Eristatakse kolme haiguse vormi: interdigitaalne, skvamoosne ja düshidrootiline. Interdigitaalne vorm paikneb kolmanda ja neljanda või neljanda ja viienda varba vahel. Tavalised sümptomid on sügelemine ja valulikkus, kuid haiguse edasi arenedes võib esineda ka leemendust. Skvamoosse vormi korral on peamiselt tallavõlvil iseloomulik kuiv helbeline ketendus, võimalik on ka paksenenud sarvkestaga kaetud villide teke. Düshidrootse vormi korral tekivad tallavõlvil, varvaste alusel ja külgedel läbipaistva sisaldusega villid, mis on kaetud sarvkestaga (Richardson & Warnock 1997). Jalaseent põhjustavad tavaliselt inimeselt inimesele levivad dermatofüüdid *T. rubrum* või *T. mentagrophytes* harvem *E. floccosum* (Hanuksela et al 2007).

Käte naha seenhaigus e *tinea manuum* on dermatofüüdi infektsioon, kas ühel või mõlemal käel, sõrmede vahel, peopesas või käeseljal. Käte naha seenhaigusel eristatakse skvamooset ja silenahale iseloomulikku koldelist vormi. Skvamooset-hüperkeratooset vormi iseloomustab erüteem ning peenehelbeline ketendus. Enamasti on haaratud peopesa kogu ulatuses ja kõik sõrmed. Peamised tekitajad on antropofiilsed dermatofüüdid *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* ja *T. rubrum*, harvem on tegu zoofiilsete liikide *T. verrucosum* ja *M. canis* või geofiilse tekitaja *M. gypseum* (Richardson & Warnock 1997).

2.3Peanaha ja juuste seenhaigus

Peanaha seenhaigus e *tinea capitis* on dermatofüüdi infektsioon peanahal, juustel, kulmu- ja ripsmekarvadel. Peanaha seenhaiguse kliiniline pilt väljendub erinevate suurustega ketendavatest kolletest ulatuslike juusteta laikudeni. Harva esineb ka ulatuslikku põletikulist reaktsiooni koos keerioni ehk infiltratiivse mädase peanaha dermatofüütiaga, mida enamasti põhjustavad zoofiilsed dermatofüüdid (Richardson & Warnock 1997). Juustega kaetud peanaha seenhaiguse kliiniline pilt võib ulatuda vähesest ketendusest ulatusliku põletikuni. Juuksekarvadel võib esineda kahte tüüpi haiguspilti: *endothrix*-tüüpi infektsiooni korral on seeneostede mass karva sees ja *ectothrix*-tüüpi infektsiooni korral karva ümber. Faavuse korral, mida põhjustab *T. schoenleinii*, ümbritsevad seeneniidid karva folliikulit peanahaga samal tasapinnal (Lutsar et al 2007). Tavalisemad juustega kaetud peanaha infektsioonide põhjustajad on *T. violaceum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *M. audouinii* ja *T. soudanense* (Hanuksela et al 2003). *M. canis* on peamine patogeen Lääne-Euroopas, *T.*

violaceum domineerib Ida- ja Lõuna- Euroopas ning Põhja-Aafrikas. *T. tonsurans* on domineeriv patogeen Põhja-Ameerikas ning muutunud sagedasemaks ka Suurbritannias. Peamiselt esineb *Microsporum sp.* nakkust 6-10 aastastel lastel, sagedamini poistel kui tüdrukutel. Vastuvõtlikumad on füüsiliselt nõrgad, alatoitumise all kannatavad või kroonilisi haigusi põdevad patsiendid (Richardson & Warnock 1997). Juba infektsiooni saanud inimese kokkupuutel perekonnaliikmete ja tuttavatega võib põhjustada infektsiooni edasikandmise kehaseene või isegi peaseene näol (Fuller 2009). Peanaha seenhaiguse kiire tuvastamine on väga oluline, sest varajane ravi aitab ära hoida haiguse tagajärjel tekkinud võimaliku kiilanemise. Dermatofüüdid hävitavad juuksekarva folliikulis oleva osa ning tulemuseks on jääv kiilaspäisus (Jensen & Arendrup 2012).

3. Traditsioonilised diagnostikameetodid

Traditsiooniline meditsiinimükoloogia tekkis varem kui klassikaline mikrobioloogia. Esimene mikroorganism, mida kirjeldati kui haiguse põhjustajat, oli seen. Itaallane Agostino Brassi avastas 1835. aastal, et liik *Beauveria bassina* on võimeline tekitama siidiussil surmava nakkuse. Esimesed teated dermatofüütide poolt põhjustatud nakkusest kirjeldavad seene morfoloogiat haigelt võetud materjalis või seene poolt tekitatud mükoosi sümptomeid. Prantsuse arst David Gryby kirjeldas aastal 1843 kaht erinevat juuksekarva nakkuse tüüpi (*ectothrix* ja *endothrix*) ning suutis isoleerida neid nakkus põhjustanud peanaha seenhaiguse tekitajad. Samuti viis ta läbi katse, mille käigus nakatas ennast edukalt patogeeniga (Mers & Wilson 2005). Peanaha seenhaiguse nakkuslikku iseloomu ja selle mikroskoopilist leidu kirjeldas peaaegu samal ajal ka P.H. Malmsten aastal 1845.

Esialgu põhines dermatofüütide taksonoomia pigem sümptomite kirjeldamisel. Seeni liigitati kliinilise pildi järgi. Aastal 1904 leiutas prantsuse dermatoloog Raymond Sabouraud meetodi, kuidas kasvatada seeni kultuuris. Erinevad mükoloogilised struktuurid olid kultuuris küll äratuntavad, kuid neid peeti võrreldes dermatofüüdi poolt tekitatud sümptomitega teisejärgulisteks. Sabouraud ise andis liigile *T. tonsurans* 10 erinevat, hiljem sünonüümseteks osutunud nime. Alles Chester Emmons (USA) tegi 1934. aastal kindlaks, et liikide klassifitseerimisel tuleb järgida seene struktuurielementide mikromorfoloogiat ja kultuuride makromorfoloogilisi tunnuseid ja viljakehade morfoloogiat, pannes sellega aluse klassikaliste botaaniliste nomenklatuuri reeglite rakendamisele ka dermatofüütide liikide puhul (Gräser et al 2008). 1952. aastal töötas Vanbreusheghem välja tehnika dermatofüütide kasvatamiseks ja isoleerimiseks väliskeskkonnast steriliseeritud karvadel (*hair-baiting technique*). See tehnika võimaldas 1961. aastal ameeriklastel Dawson'il ja Gentles'il avastada telemorfi ehk sugulise staadiumi esinemise seente elutsüklis (perekind *Arthroderma*). 1958. aastal ravis Gentles Griseofulviiniga eksperimentaalselt *Microsporum canis* nakkust meriseal, avastades sellega uue peanaha seenhaiguse ravivõimaluse. Griseofulviin on ravimina kasutusel ka tänapäeval (Elewski et al 2000)

Üheks traditsiooniliseks seeninfektsioonide laboratoorseks diagnostikameetodiks on algmaterjali mikroskoopia. Otsene koe ja kliinilise materjali mikroskoopia on üks kiiremaid ja odavamaid meetodeid. Mikroskoopia abil on võimalik tuvastada seene hüüfe ja rakke kliinilises proovis, kuid enamasti ei saa määrata dermatofüüti tekitavat liiki. Samuti ei ole võimalik vahet teha dermatofüütide poolt tekitatud infektsioonil ja teiste kottseente perekondade poolt tekitatud infektsioonidel (Luk et al 2012 ; Brillowska-Dabrowska et al

2007). Kliinilist materjali töödeltakse KOH-ga või laktofenooliga ning mikroskopeeritakse tavalise valgus- või faaskontrastmikroskoobiga. Aluseline KOH lõhustab algmaterjalis olevad epiteelrakud, leukotsüüdid ja debris. KOH-ga töödeldud preparaadid tuleb kiiresti mikroskopeerida, kuna aluseline keskkond põhjustab rakuseina struktuurielementide hävimist. Paremaks visualiseerimiseks võib kasutada algmaterjali värvimist Grami meetodiga, mille abil on võimalik näha pärmirakke ja pseudomütseeli elemente. See meetod siiski ei sobi filamentsete seente diagnostikaks, kus enamik värvub halvasti. Samuti puudub Grami meetodil seente puhul taksonoomiline tähendus, kõik seened värvuvad Gram positiivselt (bakterite puhul eristatakse Gram-positiivseid ja Gram-negatiivseid baktereid) (Lutsar et al 2007). Dermatofüütide nähtavamaks muutmisel koe sees võib kasutada fluorestseeruvat reagenti *calcofluor*-valget (*calcofluor-white*), mis värvides seene rakuseina, muudab selle tuvastamise lihtsamaks tänu intensiivsele fluorestsentsile (Murray et al 2009). Mikroskoopiat saab sooritada kohe peale kliinilise materjali võtmist, võimaldades säästa aega, mis kulub diagnoosi kinnitamisele. Mikroskoopia põhineva meetodi miinuseks on asjaolu, et 5-15% juhtudest on valepositiivseid (Brillowska-Dabrowska et al 2007).

Teiseks traditsiooniliseks diagnostikameetodiks on kliinilise materjali külv. Mükoloogiline kultuur on võrreldes mikroskoopiaga tõhusam diagnostikameetod, kuna tekitaja identifitseeritakse liigilisel tasemel, mis on sageli oluline ravi seisukohalt (Richardson & Warnock 1997). Enamik patogeensetest seentest kasvab kunstlikul söötmel. Üks põhjustest, miks mikroskoopial positiivse proovi kasvatamine kultuuris ei pruugi õnnestuda, on asjaolu, et mõned patsiendid on proovinud enne arsti juurde pöördumist iseseisvalt ravida infektsiooni. Mikroskoopial on seenehüüfid näha, kuid pole võimalik kindlaks teha, kas need on elujõulised (Gräser et al 2012). Sagedamini kasutavaks söötmeks on glükoosi ja peptoone sisaldav Sabouraud agar, mille pH on 5.6. Nõrgalt happeline keskkond soodustab paljude seente kasvu, pärssides samas bakterite kasvu. Selektiivsuse suurendamiseks lisatakse bakterite kasvu pidurdavaid antibiootikume. Seente isoleerimisel mittesteriilsetest materjalidest lisatakse söötmesse tsükloheksamiidi, mis pidurdab saprofüütsete seente kasvu. Lisaks on selektiivsöötmete puhul puuduseks asjaolu, et need mõjutavad seene morfoloogiat, tekitades seega raskusi isoleeritud liigi samastamisel (Lutsar et al 2007). Kultuuri kasvatamine kestab 1-4 nädalat, olenevalt dermatofüüdi liigist, kuna dermatofüüdid on üldiselt aeglase kasvuga. Näiteks *Candida* perekonna seened kasvavad üldjuhul söötmel 24-72 tunni jooksul ja külvi võib tunnistada negatiivseks juba 7 päeva möödumisel (Lutsar et al 2007). Juba kasvama läinud kultuure tuleks hoida hästi ventileeritud ruumis, 25-30 °C temperatuuri vahemikus.

Üldiselt kasutavad kliinilised laborid võimalikult vähe spetsiifilisi söötmeid, osalt seetõttu, et enamikus analüüsitavatest proovidest esinevad samad liigid ja tüüpilised seenetüved, mille identifitseerimiseks on loodud referent-laborite süsteem, kuhu on võimalik esimese etapi laboris määramata jäänud seened edasiseks identifitseerimiseks saata. Mõnikord ebaõnnestub kultuuri identifitseerimine, kuna dermatofüüt ei moodusta liigile omaseid morfoloogilisi tunnuseid. Mükoloogilise kultuuri kasvatamise meetodi tundlikkus on madal (~70%) ja võtab kaua aega ning võib osutuda keeruliseks, seetõttu püütakse leida alternatiivseid meetodeid liikide tuvastamiseks (Bergmans et al 2009). Kultuuride identifitseerimisel kliinilistes laborites on probleemiks professionaalsete oskuste puudumine – seeni ei osata määrata. Hollandis osales 50 erinevat laborit aastadel 1991-2002 võrdluskatses, kus tuli identifitseerida 1172 dermatofüüdi isolaati, liigi määramine õnnestus ainult 56% juhtudest (Bergmans et al 2009).

Mõnede dermatofüütide liigid nagu *Epidermophyton floccosum*, *T. rubrum*, *T. verrucosum* ja *M. canis* võib enamasti usaldusväärselt tuvastada fenotüüpiliste kultuuritunnuste ja mikromorfoloogia põhjal. Samuti ei ole molekulaarsete meetodite kasutuselevõtt mõjutanud nende liikide liigikontseptsiooni. Samas on rida liike, mille identifitseerimine fenotüüpiliste ja kliiniliste tunnuste alusel on raskendatud, nende liikide puhul on pärast molekulaarsete tunnuste kasutuselevõttu (*multilocus sequence typing* e MLST) reorganiseeritud mitmed liikide rühmad ja varasemad kompleksliigid. Molekulaarsete tunnuste alusel on sünonüümseks tunnistatud rida liike, millest annab ülevaate tabel (1).

Tabel. 1. Dermatofüütide rühma kuuluvad liigid, nende ökoloogilised rühmad ja rDNA ITS järjestuste alusel sünonüümseks tunnistatud liigid

Uue liigi mõiste	Geenipanga nr(tüüpliigil)	Sünonüümsed taksonid
Imetajatega seotud dermatofüüdid		
<i>Trichophyton equinum</i>	EF067316	Kõik varieteetid <i>T. equinum</i>
<i>T. tonsurans</i>	EF043270	Kõik varieteetid <i>T. tonsurans</i>
<i>T.interdigitale</i> (Antropofiil)	AF168124	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>goetzii</i> , <i>interdigitale</i> , <i>nodulare</i> , <i>T. kraidenii</i>
<i>T. interdigitale</i> (Zoofiil)	AY062119	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> , <i>granulosum</i> , <i>T. verruconsum</i> var. <i>Autotrophicum</i>
<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	Z98014	Identne
<i>T. mentagrophytes</i>	Z97995	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>quinckeanum</i> , <i>T. langeronii</i> , <i>T. sarkisovii</i>
<i>T. schoenleinii</i>	Z98011	Identne
<i>A. simii</i> / <i>T. simii</i>	Z98017	Identne
<i>T. concentricum</i>	Z98012	Identne

Tabel 1. (Jätkub)

<i>T. verruconsum</i>	Z98003	Kõik varieteedid <i>T. verrucosum</i>
<i>T. erinacei</i>	Z97997	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>Erinacei</i>
<i>A. benhamiae</i>	Z98015	Identne
<i>T. anamorph</i> of <i>A. benhamiae</i>	Z98016	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>Granulosum</i>
<i>T. rubrum</i>	Z97993	<i>T. fischeri</i> , <i>T. kanei</i> , <i>T. raubitschekii</i>
<i>T. rubrum</i> (Aafrika populatsioon)	AF170473	<i>T. raubitschekii</i> , <i>T. soudanense</i> , <i>T. gourvilii</i> , <i>T. megninii</i>
<i>T. violaceum</i>	AJ270811	Kõik varieteedid <i>T. violaceum</i> , <i>T. yaoundei</i>
<i>Epidermophyton floccosum</i>	AJ000629	Identne
<i>Micrpsorum audouinii</i>	AJ000622	<i>M. langeronii</i> , <i>M. rivalieri</i>
<i>M. canis</i>	AJ000619	<i>M. distortum</i> , <i>M. equinum</i>
<i>M. ferrugineum</i>	AJ252336	Identne
Geofiilsed <i>Microsporum</i> liigid		
<i>A. gypseum</i> / <i>M. gypseum</i>	AJ970141	<i>M. appendiculatum</i>
<i>A. incurvatum</i> / <i>M. gypseum</i>	AJ970153	Identne
<i>A. fulvum</i> / <i>M. fulvum</i>	AJ000627	<i>M. vanbreuseghemii</i>
<i>A. periscolor</i> / <i>M. periscolor</i>	AJ000615	Identne
<i>A. grubyi</i> / <i>M. gallinae</i>	AJ000612	<i>M. vanbreuseeghemii</i>
<i>A. borellii</i> / <i>M. amazonicum</i>	AJ877220	Identne
<i>A. racemosum</i> / <i>M. racemosum</i>	AJ970146	Identne
<i>A. cajetanum</i> / <i>M. cookie</i>	AJ970145	Identne
<i>A. obtusum</i> / <i>M. nanum</i>	AJ970149	Identne
<i>A. cookiellum</i>	AM000034	Identne
<i>A. corniculatum</i>	AJ000612	Identne
<i>M. praecox</i>	AJ970148	Identne
<i>M. Tuboisii</i>	AJ970142	Identne
Geofiilsed <i>Trichophyton</i> liigid		
<i>A. gertleri</i> / <i>T. vanbreuseghemii</i>	AJ877210	Identne
<i>A. glorie</i> / <i>T. glorie</i>	AJ877209	Identne
<i>A. ciferii</i>	AJ877217	Identne
<i>A. flavescens</i> / <i>T. flavescens</i>	AJ877219	Identne
<i>A. uncinatum</i> / <i>T. ajelloi</i>	AJ877212	Kõik varieteedid <i>T. ajelloi</i> , <i>E. stockdaleae</i>
<i>A. quadrifidum</i> / <i>T. terrestre</i>	AJ877214	Identne
<i>A. lenticulare</i> / <i>T. terrestre</i>	AJ877211	Identne
<i>A. insingulare</i> / <i>T. terrestre</i>	AJ000606	Identne
<i>A. olidium</i> / <i>T. eboreum</i>	AJ876907	Identne
<i>A. ciferrii</i> / <i>T. georgiae</i>	AJ877217	Identne
<i>A. melis</i> / <i>T. melis</i>	AJ877216	Identne
<i>T. thuringiense</i>	AJ877215	Identne
<i>T. phaseoliforme</i>	AJ970152	Identne
<i>A. multifidum</i> / <i>Chrysosporium</i> sp.	AJ877218	Identne
<i>A. tuberculatum</i> / <i>Chrysosporium</i> sp.	AJ877221	Identne
<i>A. Curreyi</i> / <i>Chrysosporium</i> sp.	AJ877223	Identne
<i>A. cuniculi</i> / <i>Chrysosporium</i> sp.	AJ000609	Identne
<i>Chrysosporium vespertilium</i>	AJ007846	Identne
<i>Ctenomyces serratus</i> / <i>Chrysosp.</i>	AJ877222	Identne

Näiteks ei leia molekulaarsete tunnuste alusel enam toetust fenotüübilt ja geograafiliselt levikult liigist *T. rubrum* selgelt eristatav liik *T. soudanense*, mis on nüüd esimesega sünonüümne (Gräser et al 2008).

Epidemioloogiliste andmete kogumiseks ja võrdlemiseks, raviotsuste ja ravimuuringute läbiviimiseks on dermatofüütiat põhjustava seeneliigi korrektne määramine ülioluline. Suurematest taksonoomilistest ümberkorraldustest on hoidutud mitmeid aastaid, osalt seetõttu, et MLST on sugukonna *Arthrodermataceae* fülogeneesi uurimisel rakendatud alles viimastel aastatel, osalt seetõttu, et mitte tekitada segadust praktikute seas, kes igapäevaselt dermatofüütide poolt põhjustatud haigusi diagnoosivad.

Kawasaki (2011) sekveneeris 11 *Trichophyton* ja 3 *Arthoderma* liigil 4 erinevat DNA regiooni 34 erinevast isolaadil. Sekveneeriti rDNA ITS1 ja ITS2 järjestust, toposiomeraas II geeni (TOP), aktiini geeni (AKT) ja GPD (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) geeni. Katse eesmärk oli uurida erinevate DNA regioonide kasutamise võimalusi taksonoomilise eristuse eesmärgil, et paremini mõista fülogeneetilisi suhteid perekonna *Trichophyton* liikide vahel. Telemorfse perekonna *Arthoderma* kolme liigiga on seotud tunduvalt rohkem anamorfe perekonnast *Trichophyton*. Iga regiooni tulemuste põhjal koostati fülogeneetiline puu. Nende omavahelisel võrdlusel selgus näiteks toposiomeraas II sekveneerimise tulemuste põhjal koostatud fülogeneesipuu konstrueerimisel, et *T. rubrum* ja *A. simii* moodustasid ühise rühma. ITS ja AKT põhjal koostatud fülogeneesipuudel oli *T. rubrum* ühes rühmas liigiga *A. benhamiae*. Autorid juhivad tähelepanu asjaolule, et ainult ITS järjestuste põhjal ei ole mõttekas nomenklatuuris muutusi teha, kuna erinevate DNA sekveneerimisel saadud fülogeneesipuud ei kattu.

4. Dermatofüütide identifitseerimine MALDI-TOF mass-spektromeetriga

Mass-spektromeetria on tehnoloogia, mis mõõdab molekulide massi. Molekulid fragmenteeritakse ioonideks, mille massi saab täpselt mõõta. Iga molekul koosneb ioonidest ja aine molekulmass võib erineda, sõltuvalt ioonide erinevatest laengutest. Molekulide iseloomustamiseks saab kasutada molekulmassi, laengu indeksit või ioonide spektrit. Massispektromeeter registreerib ainele omase massispektri.

Protsessi alguses suunatakse molekulile elektronkiir, mis ergastab molekuli ning eralduvad ioonid. Edasi suunatakse ioonid kurvilisse vaakumtorru, läbi mille nad liiguvad erineval kiirusel tänu magneetilisele väljale. Kurvid elimineerivad liiga suured ja liiga väikesed ioonid nii, et massispektromeetrisse jõuavad vaid õige suurusega ioonid. Detektor mõõdab vaakumtorus ioonide lendamise aega, mis sõltub ioonide massist ja laengust (väikese massiga ioonid liiguvad kiiremini kui suure massiga). Spektromeeter genereerib ioonile omast massi, laengut ja lennuaega, arvestades vastavalt valemile $\frac{m}{z} = \frac{2t^2K}{L^2}$ (m on iooni mass, z on iooni laeng, t on lendamise aeg, K on iooni kineetiline energia ja L on lendamise kaugus) spektrogrammi, mis on ainele ainuomane. Esialgu ei suudetud selle tehnoloogia abil suuri molekule, nagu valgud, mõõta. Viimase mõõtmise tegi võimalikuks kaks muutust mass-spektromeetrias. Esiteks MALDI (*matrix assisted laser desorption ionization*) tehnika kasutusele võtmine. MALDI tehnika seisneb selles, et valgud pannakse enne ionisatsiooni tahkesse matriitsi. Matriits absorbeerib ja kannab laseri energia valkudeni, mille tõttu valgud vabastavad erinevaid ioone. Teiseks asendati magneetiline väli elektrilise väljaga, mis suunab ioone samamoodi läbi vaakumtoru, mille otsas on TOF (*time-of-flight*) detektor, mis mõõdab ioonide liikumiseks kulunud aja, mis on omakorda proportsionaalne energiahulgaga, mis suunati esialgu ioonile (Clark & Pazdernik 2007). Mass spektromeetri ehitus on skemaatiliselt kujundatud joonisel 1 (Vt Lisa1).

Alates aastast 2010 on mass-spektromeetria võimalusi kasutatud mikroobide identifitseerimiseks. On loodud mitmesuguse eesmärgiga andmebaase bakterite identifitseerimiseks nende liigispetsiifiliste massispektrite alusel, näiteks vee puhtuse hindamiseks või kliiniliste patogeenide identifitseerimiseks (Zhou et al 2010).

Nenoff koos kaasautoritega (2013) koostas 21 kliiniliselt olulise dermatofüüdi liigi unikaalsete vakude massispektrite andmebaasi, kasutades MALDI-TOF tehnoloogiat. Loodi liikide ja tüvedevaheliste kauguste dendogramm, mille aluseks olid erinevused ioniseeritud valkude spektrites. Enamiku ioniseeritud valkude massid, mida liigile või seenetüvele

iseloomuliku nn „sõrmejäljemustri“ saamiseks kasutati, jäid suurusvahemikku 2000 – 20 000 Da, valdavalt alla suuruse 13 000 Da. Kõik graafikud analüüsiti SARAMIS (*Spectral Archiving and Microbial identification System*) tarkvaraga. Kuna varasemalt on selle tehnoloogia abil tuvastatud vaid bakterite liike, siis sooritati võrdluseks 164-l juhul dermatofüütide liikide identifitseerimine sekveneerides rDNA, ITS1, 5.8S ja ITS2 regioonid ning 285-l juhul tavapärane kultuurile iseloomulike mikro- ja makromorfoloogilistel tunnustel põhinev liikide määramine. Katse käigus analüüsiti 285 proovi 21-st erinevast liigist. MALDI-TOF analüüs kinnitas DNA analüüsi 99.3% juhtudest. Tavapäraseid kultuuritunnuseid kasutades osutus probleemseks liikide määramine geofiilsete liikide rühmas nii perekondades *Trichophyton* kui *Microsporum*, samuti zoofiilsete perekonna *Trichophyton* liikide rühmas. Liiki *T. shoenleinii* ei suudetud laboris rutiinse külvimeetodi abil identifitseerida. MALDI-TOF tehnoloogia suutis korrektselt eristada fülogeneetiliselt lähedasi liike nagu *T. rubrum* ja *T. violaceum*. Erinevate meetodikate saadud tulemused 164 dermatofüüdi tüve liigi määramisel on esitatud tabelis 2.

Tabel 2. Sekveneerimisel, kultuuritunnustel ja MALDI TOF massispektrite analüüsimisel saadud tulemuste võrdlus 164 dermatofüüdi tüve määramiseks (Nenoff 2013 järgi)

Liik	Kõik	Traditsiooniline		Malditof MS		PCR	
		Testitud	Kinnitatud	Testitud	Kinnitatud	Testitud	Kinnitatud
<i>Trichophyton rubrum</i>	24	24	24	24	24	24	24
<i>Trichophyton violaceum</i>	24	24	17	24	22	24	24
<i>Trichophyton interdigitale</i>	21	21	21	21	21	21	21
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	17	17	0	17	17	17	17
<i>Trichophyton</i> species of <i>Arthroderma benhamiae</i>	10	10	0	10	10	10	10
<i>Trichophyton tonsurans</i>	9	9	5	9	9	9	9
<i>Trichophyton verrucosum</i>	7	7	7	7	7	7	7
<i>Trichophyton equinum</i>	3	3	3	3	3	3	3
<i>Trichophyton balcaneum</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Trichophyton eboreum</i>	1	1	0	1	1	1	1
<i>Microsporum canis</i>	22	22	21	22	22	22	22
<i>Microsporum audouinii</i>	9	9	9	9	9	9	9
<i>Microsporum fulvum</i>	3	3	0	3	3	3	3
<i>Microsporum gypseum</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Microsporum racemoseum</i>	2	2	0	2	2	2	2
<i>Microsporum cookei</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Microsporum ferrugineum</i>	1	1	0	1	1	1	1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	2	2	2	2	2	2	2

Tabel 2. (Jätkub)

<i>Arthroderma quadrifidum</i>	3	3	1	3	3	3	3
<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	2	2	0	2	2	2	2
<i>Arthroderma incurvatum/</i> <i>Microsporium gypseum</i>	1	1	0	1	1	1	1
Total	164	164	113	164	162	164	164
Percentage	100	100	68.9	100	98.8	100	100

Kehtiva taksonoomia kohaselt on *T. mentagrophytes* kompleksis eristatud 4 liiki: *T. interdigitale* (antropofiilsed ja zoofiilsed tüved), *T. mentagrophutes*, *T. erinacei* ja *Trichophyton* anamorf *A. benhamiae*. MALDI-TOF massispektrite põhjal oli võimalik eristada liike *T. interdigitale* ja *A. benhamiae*. Liigi *T. interdigitale* zoofiilsete ja antropofiilsed tüvede eristamine massispektrite järgi ei õnnestu (Nenoff et al 2013)

MALDI-TOF tehnoloogiat võib pidada kultuuri morfoloogial põhineva analüüsi edasiarenduseks. Siiski säilivad põhilised probleemid, mis kaasnevad kultuuri kasvatamisega. Tihtipeale ei õnnestu meditsiinilisest materjalist kasvatada kultuuri ja kui õnnestub, siis võtab see väga kaua aega. Kindlasti peab arvestama, et SARAMIS andmebaas Biotyper (Bruker Daltonics, Saksamaa), mida mikrobioloogia laborites kasutatakse, võimaldab väheste liikide tuvastamist (Theel et al 2011).

5. Polümeraas ahelreaktsioonil põhinevad dermatofüütia diagnostika meetodid

Molekulaarsed tehnoloogiad leiavad järjest rohkem kasutust meditsiinilistes mikrobioloogia laborites mikroobide liigilises määramises ja kliinilise materjali identifitseerimisel, kuna võimaldavad palju kiiremat ning spetsiifilisemat liigilist identifitseerimist. Dermatofüütide puhul on liigi kindlaksmääramine eriti oluline, kuna tihtipeale sõltub sellest edasine ravi (Jensen & Arendrup 2012). Näiteks küünte seenhaigus ehk onühhomükoosi ravimine võib aega võtta sõrmeküünte puhul kuni 6 kuud ja varbaküünte puhul isegi aasta või kauem (Mims et al 2004).

DNA peenstruktuuri määramisel on meetoodiliselt vajalik üliväikeste DNA koguste paljundamine. *In vivo* (rakus) on mehhanism, millega DNA koopiaarv (*DNA copy number*) tõuseb ehk toimub DNA amplifikatsioon (*DNA amplification*). See on tuntud nähtus plasmiidide ja viiruste replikatsioonil. *In vitro* (katseklaasis) saab DNA-d paljundada polümeraasi ahelreaktsiooni ehk PCR- (*polymerase chain reaction*) meetodil. Meetodi avastasid Kjell Kleppe (1934-1988) ja H. G. Kohorana juba 1971.aastal ja selle arendas laialt rakendatavaks meetodiks Kary Mullis (Heinaru 2012).

Selleks, et PCR saaks toimuda, on vaja kaheaahelalist DNA-d, praimereid, DNA polümeraasi koos talle esmatahtsa katiooni Mg^{2+} , puhvrit ning nelja nukleotiidi dATP, dCTP, dGTP ja dTTP segu, mida kutsutakse ka dNTP-deks ning millest ehitatakse üles uus DNA ahel. Kuna DNA polümeraas saab sünteesida uut ahelat vaid üheaahelaliselt DNA-lt, on esimeseks sammuks DNA ahela denatureerimine. Seda saavutatakse temperatuuri tõstmisega 95 °C-ni (Nuovo 1994). Peale seda alandatakse temperatuuri, et praimerid saaksid kinnituda DNA külge. Praimerid on disainitud nii, et mõlemad seonduvad erineva denatureerinud ahela külge (Clark & Pazdernik 2007). Praimeri 3'-OH-ots on sünteesi algussaidiks ja matriitsina kasutatakse vanem-DNA-ahelat (Heinaru 2012). Viimase etapina tõstetakse temperatuur 70 °C-ni, et Taq polümeraas saaks sünteesida uue ahela (Clark & Pazdernik 2007). Algul kasutati PCR-reaktsioonil *E.coli* DNA polümeraas I-te, kuid see polümeraas on temperatuuritundlik ja sellepärast on vaja igas replikatsioonitsüklis lisada uus kogus polümeraasi. Tänapäeval kasutatakse termofiilist *Thermus aquaticus* isoleeritud temperatuuriresistset Taq-polümeraasi (*T. aquaticus polymerase*). Selle polümeraasiga viiakse läbi korduvaid PCR tsükleid. Erinevalt enamusest DNA polümeraasidest, pole kahjuks Taq-polümeraasil 3'-5'korrektsioonilist aktiivsust (3'-5' *proofreading activity*), mistõttu tema töötamisel tekib tavalisest palju rohkem vigu (Heinaru 2012).

Pärast esimest PCR tsüklit kordub kogu protsess tsükliliselt. Kaks tekkinud DNA ahelat denatureeritakse kõrgel temperatuuril. Temperatuuri langedes kinnituvad praimerid ning Taq polümeraas sünteesib neli uut ahelat, mille tulemusena tekib 4 uut kaksikheeliksi (Clark & Pazdernik 2007). Selliselt kasvab DNA-fragmentide arv eksponentsiaalselt: ühes replikatsioonitsükliks tekib 2 kaksikheeliksi, kahes tsükliks 4, kolmes 8, neljas 16, kümnes tsükliks 1024 jne. PCR-meetod võimaldab oluliselt lihtsustada DNA järjestuste analüüsi, sest uuritava algmaterjalina on võimalik kasutada üliväikest DNA hulka (Heinaru 2012).

PCR protseduur nõuab temperatuuri pidevat muutmist tsükliliselt. Sellist temperatuuri vahetust on võimalik saavutada termotsükleri (*thermocycler*) abil, mille soojusplokk reguleerib temperatuuri vastavalt sisestatud programmi järgi etapiliselt. Iga tsükli läbimiseks kulub mõni minut. Erinevate tsüklite temperatuur kõigub vahemikus 94 C°, kui toimub DNA lagundamine, 50-60 C° vahel kui toimub praimerite kinnitumine ning 70 C° juurde, kui Taq polümeraas sünteesib uut komplementaarset ahelat. Esimene PCR teostati, tõstes proove erinevate veeanumate vahel, kus oli vastavalt erinevad temperatuurid (Clark & Pazdernik 2007).

5.1 DNA eraldamine

Dermatofüütide molekulaarse diagnostika õnnestumisel on väga oluline seene DNA eraldamine. Ideaalne DNA eraldus võimaldaks eraldada dermatofüütide rakkudest DNA-d samal ajal vähendades patsiendi enda DNA hulka proovis. Kuna sellist meetodit pole veel leiutatud on väga oluline, et patsiendilt saaks koguda võimalikult palju kvaliteetset kliinilist materjali. Analüüsiks vajalikku materjalikogust pole võimalik standardiseerida kuna visuaalsel vaatusel pole võimalik seene olemasolu tuvastada ning haiguskoldest kogutud materjalis seene DNA tuvastamine on statistiline protsess. Mida rohkem materjali uuritakse, seda suurem on tõenäosus avastada infektsiooni põhjustaja. Soovituslik on DNA eraldamist alustada mitte vähemast kui 3 mg proovimaterjalist (Gräser et al 2012). DNA eraldamiseks on leiutatud väga palju erinevaid meetodeid: materjali homogeniseerimine manuaalselt, klaaspärlitega purustamine, külmutamise ja sulatamisega töötlus ning traditsiooniline DNA eraldamine fenooli ja kloroformi abil. Järjest rohkem on hakatud kasutama Proteaas K ensüümaatilist seedimist, millele järgneb manuaalne või automaatne DNA eraldamine (Jensen & Arendrup 2012).

Tavaliselt kasutatakse mitmeid meetodeid kombineeritult. Esiteks peab DNA eraldamiseks purustama rakukesta. Varasemad protokollid on üsnagi komplitseeritud: panna kude

steriilsesse tuubi ning lisada 190 µl lahust, milles on 0.1 M Tris HCl ja 1% SDS. Sellele lahusele lisada 10 µl Proteaas K-d. Peale seda inkubeeritakse kude 3 tundi kuni ööpäev 55 C° juures. Pärast töötlust on kude lagundatud ning sellele järgneb DNA puhastamine. Selleks lisatakse 200 µl fenooli ja segatakse Vortex masina abil. Peale seda lisatakse kloroform ja isoamüül-alkohol vahekorras 24:1 ning sooritatakse uuesti segamine Vortexi abil. Proov pannakse tsentrifuugi 1 minutiks, mille jooksul sadeneb DNA tuubi põhja. Siis eemaldatakse supernatant, lisatakse uus kogus kloroformi, isoamüül-alkoholi segu ning teostatakse tsentrifuugimine. Peale seda eemaldatakse supernatant ning lisatakse 25 µl 3M NaOAc ja 900 µl 100%-list etanooli ning segatakse korralikult. Nüüd inkubeeritakse segu -70 C° juures 30 minutit, tsentrifuugitakse 15 000 rpm juures 15 minutit, eemaldatakse kogu vedelik tuubist ning kuivatatakse põhjas olev sade õhu käes. Lõpuks lisatakse 25 µl destilleeritud vett (Nuovo 1994).

Erinevate firmade poolt on välja töötatud ja patenteeritud mitmeid automaatseid DNA eraldamise meetodeid, mida erinevad autorid on kasutanud kombineeritult dermatofüütide DNA eraldamiseks erinevate PCR-põhiste meetodite tarbeks. Näiteks Roche (Mannheim, Germany) on patenteerinud *MagNA Pure Compact DNA™* eraldamise komplekt (*kit*). Eraldamise alguses lisatakse 180 µl *MagnaPure Bacteria Lysis Buffer*, mille koostis on salastatud, 20 µl Proteaas K ja 300 µl destilleeritud vett. Peale seda DNA-d inkubeeritakse 65 C° juures 20 minutit. Seda protsessi nimetakse eel-lüüsiks (*pre-lysis*). Peale eel-lüüsi toimub automaatne DNA eraldamine. Selleks võetakse eel-lüüsi käigus tekkinud supernatandist 400 µl ning pannakse see *MagNA Pure Compact* nukleiinhapete eralduse masinasse. Eralduse läbiviimisel jälgitakse Roche poolt loodud protokoll ja kasutatakse *MagNA Pure Compact*-i nukleiinhapete isolatsiooni eraldamise komplekti. Protsessi lõpetuseks lisatakse eraldatud DNA-le 100 µl puhvrit (Bergman et al 2013).

DNA eradamisel peab meeles pidama, et kliiniline materjal, kust seene DNA-d eraldatakse võib olla väga erinev. Kindlasti ei saa kasutada sama meetodit DNA eraldamiseks küüneproovist ja verest. Näiteks ühes uurimuses, kus DNA eraldati kultuurist, lüüsi rakke kõigepealt 37C° juures 1 tund ning peale seda lisati segusse happega steriliseeritud klaaspärlid ning tehti põhjalik segamine Vortexi abil. Verest DNA eraldamiseks kasutati ainult vererakke lüüsivat puhvrit (Landlinger et al 2009).

Vaieldamatult on molekulaarsete meetodite väljatöötamise üheks oluliseks osaks DNA eraldamine ja puhastamine. Sellest sõltub nii katse õnnestumine kui ka molekulaarse analüüsi tulemus. Lisaks sellele on väga oluline ka ajaline kulu, mis kulub DNA eraldamiseks ja

puhastamiseks (Jensen & Arendrup 2012). Mida kiirem on see etapp dermatofüütide diagnostikas, seda kiiremini jõuavad analüüsi tulemused arstide kätte ning saab alustada ravi.

5.2 DNA amplifikatsiooniks vajalikud praimerid

Selleks, et saaks toimuda polümeraasne ahelreaksioon, mille käigus paljundatakse DNA fragmenti, vajatakse praimereid. Praimerid on oligonukleotiidid, mis on umbes 8-20 nukleotiidi pikkused (Clark & Pazdernik 2007). Praimerid tuleb disainida väga spetsiifiliselt. Üks praimer peab omama sama nukleotiidset järjestust nagu DNA ülemise ahela praimerid kinnituskohas ning teine praimer peab vastama alumise ahela kinnituskohale (Nuovo 1994). Sellest võime järeldada, et me peame teadma amplifitseeritava DNA järjestust, et disainida praimerid.

Tänapäeval praimereid tavaliselt enam käsitsi ei disainita. Selleks kasutatakse erinevaid arvutiprogramme. Näiteks on kasutatud firma Informax poolt loodud programmi VectorNTI, et disainida *Trichophyton* perekonnale spetsiifilised praimerid Trich302 ja Trich302rev (Brillowska-Dabrowska et al 2010). Disainimise aluseks võetakse juba sekveneeritud dermatofüütide genoomid, geenid või geenipiirkonnad, mida on võimalik interneti andmebaasidest vaadata ja allalaadida. Selline andmebaaside kogum on näiteks NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), kus on võimalik vaadata erinevaid andmebaase. CBS ehk Centraalbureau voor Schimmelcultures (Holland) dermatofüütide veebileheküljel (<http://www.cbs.knaw.nl/dermatophytes/DefaultPage.aspx>) on saadaval avalikud andmebaasid erinevate dermatofüütide rDNA ITS-järjestustega.

Põhilised sihtmärk geenid dermatofüütide puhul on ribosoomaalse RNA geenide regioonid 18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 26S, 28S, topoismeraas II geen, β -tubuliin, translatiooni elongatsioonifaktori ja kitiini geenid (Jensen & Arendrup 2012; Brillowska-Dabrowska et al 2007). Geen kitiini süntaas 1 (CHS1) on sugukonna *Arthrodermataceae* tugevalt konserveerunud ning võimaldab eristada dermatofüüte (*Trichophyton*, *Microsporum* või *Epidermophyton*) kui rühma. Kui soovime täpsustada haiguse tekitaja liigi tasemel, tuleks praimerid disainida ribosomaalse RNA geenidele ja nende vahel paiknevate mittetranskribeerivate järjestustele (ITS). Sugukonna fülogeneesipuu näitab ITS1, ITS2, 5.8S regioonide põhjal saab eristada enamikku perekondade *Epidermophyton*, *Microsporum* ja *Trichophyton* liikidest (Gräser et al 1999). Teatud liikide ja liikide komplekside lahutamiseks on vajalik kasutada mitut praimerit erinevate märklaud-geenide suhtes samaaegselt. Näiteks

liikide *T. tonsurans* ja *T. equinum* eristamiseks on kasutatud β -tubuliini ja translatsioonifaktorit (Rezaei-Matehkolaei et al 2012).

Kliiniliste proovide analüüsimiseks mõeldud PCR-põhiseid teste võib disainida proovimaterjalile ja haiguskolde asukohale spetsiifiliselt. Võib teha molekulaarse testpaneeli ainult küüne patogeenidele või peanaha patogeenidele. Universaalse, kõiki võimalikke inimesel nakkusi põhjustavaid dermatofüüte kaasava ja kõiki võimalikke proovimaterjale haarava testi disainimine pole seni õnnestunud. Seda peamiselt seetõttu, et tegemist on väga lähedaste liikidega ning praimerite disain ülimalt komplitseeritud. PCR tehnoloogia efektiivsus seisneb praimerites. Kui praimerid ei kinnitu õigetesse kohtadesse või kinnitunud praimerite vahel on liiga suur vahemaa või kui praimerid tekitavad juuksenõelastruktuuri (*hairpin structures*), siis Taq polümeraas pole võimeline uut DNA ahelat sünteesima. Praimerid ei tööta ka sellisel juhul, kui kinnituvad mõlemad ühe ja sama DNA ahela külge (Clark & Pazdernik 2007). Kuigi selline PCR käik on väga haruldane ning ebaõnnestumise põhjusi on soovitatav otsida mujalt (Nuovo 1994).

Rohkem kui 80% küünte seenhaiguse ehk onühhomükoosi juhtumidest on põhjustanud liik *T. rubrum*, mille tõttu kliinilistes testides kasutatakse ainult liigi *T. rubrum* jaoks disainitud spetsiifilisi primereid või praimerite paari dermatofüütide, kui rühma tuvastamiseks (Brillowska-Dabrowska et al 2007). Selline lähenemine võimaldab kiirelt ja lihtsalt ilma täiendavat PCR sooritamata tuvastada infektsiooni 80% haigusjuhtudest. Kuid tuleb arvestada ka ülejäänud 20% haigusjuhtudega. Varem arvati, et mittedermafütide poolt põhjustatud infektsiooni protsent jääb vahemikku 1.45-17.6, kuid ühes kliinilises uurimuses, mis seisnes mittedermafütide identifitseerimises leiti, et see protsent on isegi 38. Sinna hulka on arvatud ka infektsioonid, mis olid põhjustatud nii dermatofütide kui ka mittedermafütide poolt korraga. Selle uurimuse jaoks disainiti spetsiifilised praimerid ehk FUP (*funga universal primers*), mis võimaldavad tuvastada 28S ribosomaalset RNA-d kõigis meditsiiniliselt olulistes seentes (Ebihara et al 2009).

Kuna liigi määramine on tõhusa ravi seisukohalt väga oluline, liigub tänapäeva molekulaarne diagnostika võimalikult paljude erinevate liikide tuvastamise suunas. Samas nõuab väiksema tundlikkuse ja spetsiifilisusega mikroskoopia ja külvimeetodil põhineva diagnostika asendamine tundlikuma, kuid ainult teatud patogeenide rühmas (antropofiilsed ja zoofiilsed dermatofüüdid), laiemat arutelu. Patogeeni liigi määramine aitab määrata ka võimalikku nakatumise allikat ning võib omada prognostilist tähendust. Antropofiilsed dermatofüüdid tekitavad raskesti ravitavat kroonilise kuluga infektsiooni. Zoofiilsed ja geofiilsed

dermatofüüdid tekitavad ravile hästi alluvat või iseparanevat põletikulist reaktsiooni (Lutsar et al 2007). Mitme liigi tuvastamiseks on kasutatud mitmepraimerilist PCR (*multiplex PCR*), kus PCR segusse lisatakse rohkem kui üks paar praimereid. Näiteks kasutati ühes protokollis algselt PCR reaktsioonis praimereid nii dermatofüütide kui rühma ning ka *T. rubrum* tuvastamiseks. Esmase PCR reaktsiooniga suudeti kliinilises katses infektsiooni tekitaja tuvastada 93% kõigist proovidest. Ülejäänud proovide tuvastamiseks sooritati kordus PCR, kus lähtuti kliinilisest materjali tüübist ehk siis, kas tegu oli naha, küünte või juustega. Nahast ja küüntest saadud materjali korral sooritati PCR kasutades spetsiifilisi praimereid, mis tuvastavad perekonna *Trichophyton* teiste liikide esinemise kliinilises materjalis. Kuna juukseinfektsiooni põhjustavad põhiliselt liigid *M. canis* või *M. audouinii*, siis sooritati mitmepraimeriline PCR, mis oli võimeline tuvastama vastavate liikide esinemise patsiendilt võetud juukseproovist. Tänu sellisele lähenemisele vähendati vajadust sooritada kordus PCR ning suudeti tuvastada kõige sagedasemad dermatofüütia põhjustajad vähendades sellega nii ajalist kui rahalist kulu (Brillowska-Dabrowska et al 2010).

5.3 Ahelreaktsioon, selleks vajalikud tingimused ja edasiarendused

Meditšiiniselt arvestatavate tulemuste saamiseks, tuleb analüüsi sooritamisel järgida kindlaid nõudeid. Kindlasti on kliinilise proovi võtmisel oluline tagada steriilsus, materjali piisav hulk ning võimalikult kiire transport laborisse (Lutsar et al 2007). Kõik PCR etapid tuleks sooritada eraldi ruumides, alustades PCR eelsetest protseduuridest ja lõpetades protseduuridega, mis järgnevad PCR-le. Terve katse ajal tuleb kasutada filtriga pipetiotsikuid. Kindlatel protseduuridel nagu DNA eraldamine ja PCR reaktsiooni alustamisel tuleks kasutada desinfitseeritud tööpinda. Tööpinda saab desinfitseerida näiteks 70% alkoholiga, mis denatureerib valke rakus ning lõhub rakumembraanis olevad lipiide, mille tagajärjel nõrgeneb rakukest ning rakk hävib. Rohkem kasutatakse tänapäeval UV kiirgust, mis tekitab DNA-s nukleotiidide valesipaartumist, mille tagajärjel tekivad mutatsioonid, DNA süntees inhibeerub ja rakk hävib. Kasutatakse ka ioniseerivat kiirgust, mis samuti tekitab mutatsioone DNA-s (Baron et al 1994). Lisaks tuleks kindlasti kontrollida, et analüüsil kasutatakse ainult testitud seene-vabu reagente (Gräser et al 2012). Edasise kontaminatsiooni vähendamiseks peaks kasutama UDG ensüümi (*uracil-DNA glycosylase*). Selleks asendatakse nukleotiid dTTP nukleotiidi dUTP ning UDG on võimeline lagundama dUTP sisaldavaid PCR produkte peale analüüsi (Nuovo 1994).

Traditsioonilistele PCR meetoditele on tehtud modifikatsioone. Üheks selliseks meetodiks on *nested-PCR*. Selleks tehakse kaks järjestikku PCR reaktsiooni, mille käigus kasutakse kahte

erinevat paari praimereid. Esimese reaktsiooni käigus amplifitseeritakse DNA-d sihtmärkpiirkonnast väljapoole kinnituvate praimerite abil. Teises PCR reaktsiooni sihtmärk-DNA on esimeses reaktsioonis amplifitseeritud DNA. Nüüd kinnituvad praimerid sissepoole DNA piirkonda. Selle abil saavutatakse suurem tundlikus ja spetsiifilisus. Kahjuks tõuseb ka tõenäosus kontaminatsiooni edasikandmiseks ühest PCR reaktsioonist teise (Schuller et al 2010). Katses, kus kasutati *nested*-PCR dermatofüütide tuvastamiseks saadi esimese PCR reaktsiooni käigus 35 positiivset proovi ning teise *neste*-PCR käigus 47 positiivset proovi, mis näitab tundlikkuse tõusu. Katse jaoks disainiti ka uued praimerid, mis olid sekveneeritud 28S ribosomaalse RNA alusel (Ebihara et al 2009).

Reaalaja-PCR ehk RT-PCR abil on võimalik jälgida PCR produktide sünteesi suletud süsteemis. Selleks kasutatakse spetsiifiliselt RT-PCR jaoks loodud termotsüklerit, mis muudab temperatuuri kiiremini kui tavalised termotsüklerid. Tänu fluorestseeruvatele produktidele, tõuseb ka analüüsi tundlikus. Mida suurem on amplifitseeritud DNA hulk, seda intensiivsem on fluorestseeruv valgus (Schuller et al 2010). Dermatofüütide analüüsimiseks on loodud RT-PCR, mis suudab tuvastada 11 erinevat liiki dermatofüüte kolmes põhilises dermatofüütide perekonnas. Võimalik on analüüsida nii küüsi, nahka, kui ka juukseid. DNA eraldamiseks kasutati robotit, mis vähendas oluliselt analüüsiks kuluvat aega (Bergmans et al 2009). Hiljuti on küüneproovide analüüsiks välja töötatud protokoll, milles sooritatakse reaalaja-PCR kahes reaktsioonituubis, kus ühes tuvastatakse dermatofüütide olemasolu ning teises sooritatakse PCR-reaktsioon kahe paari praimeriga, tuvastades kas *T. rubrum* või *T. interdigitale* olemasolu. Kasutades automaatset DNA eraldust, reaalaja-PCR ning DNA sulamispunkti analüüsi, on võimalik analüüsi tulemused saada 2.5h jooksul. Samas tuubis toimunud PCR-i produkte eristatakse DNA sulamispunkti analüüsi alusel. *T. rubrum* PCR produkti sulamistemperatuur on 87.8 C° ja *T. interdigitale* PCR produkt sulab temperatuuril 89.4 C° (Bergman et al 2013). DNA sulamispunkt on keskpunkt, mille juures kaheaahelaline DNA läheb üle üheaahelaliseks DNA-ks ning seda on võimalik mõõta DNA optilise tiheduse muutumise kaudu (Clark & Pazdernik 2007).

Kui ainult PCR-i abil on tuvastatavate liikide arv tavaliselt väike, siis on võimalik seda suurendada kombineerides PCR-i ja DNA-mikrokiiptehnoloogiat. DNA-mikrokiip (*DNA microchips*) on mõneruutsentimeetrine kandja, millele on erinevatesse punktidesse kovalentselt kinnitatud kümned tuhanded spetsiifilised oligonukleotiidid DNA proovid, mida hübriiditakse spetsiifilise cDNA või cRNA proovidega (Heinaru 2012).

Eelpool mainitud DNA-mikrokiiptehnoloogias kasutati PCR-RLB (*reverse line blot*), mille abil on võimalik kovalentselt siduda oligonukleotiidsed kandjad kiibile ning hübriidida PCR käigus amplifitseeritud mRNA produktid neile vastavate kandjate külge. Kandja külge kinnitumisest annab märku fluorestseeruv märg, viimase abil tuvastatakse, millisesse piirkonda proov kinnitus, mille järgi omakorda on võimalik kindlaks teha vastavalt siis perekondlik või liigiline kuuluvus (Kudinha et al 2012). On disainitud paneel 9 erineva dermatofüüdi liigi tuvastamiseks, mis sobib küüne, naha- ja juukseproovide analüüsiks. Samaaegselt on võimalik membraanile hübriidiseerida 45 proovi, mis oluliselt vähendab proovide analüüsiks kuluvat aega (Bergmans et al 2009). Loomulikult pole see analüüsi tundlikkuse piiriks. Tehnoloogia püüdleb võimalikult paljude liikide tuvastamise poole. Näiteks on kombineeritud PCR-DM (*droplet microfluidics*) ja mikrokiiptehnoloogia, et disainida DNA kiip, mis on võimeline tuvastama 26 erinevat liiki PCR produktis (Sato et al 2010). PCR-DM käigus toodetakse kindel kogus amplifitseeritud DNA-d. See tehnoloogia võimaldab paralleelselt amplifitseerida väikestes kogustes DNA-d, vähendades kontaminatsiooni ja mittespetsiifilise DNA amplifikatsiooni PCR-reaktsiooni käigus (Zhu et al 2012). Uurimuse käigus disainiti GeneBank andmebaasis leiduvate sekveneeritud ITS järjestuste järgi liigi- ja perekonnaspetsiifilised oligonukleotiidsed järjestused, mis olid 20-29 aluspaari pikkused ja võimalikult erinevate sulamispunkti temperatuuriga ning kinnitati kovalentselt mikrokiibile. Mikrokiibile „prinditi“ 8 pikoliitrised tilgad, kasutades Bubble Jet tehnoloogiat, mis võimaldab automaatselt ja väga kiiresti luua mitmeid sarnaseid kiipe proovide analüüsiks. Iga oligonukleotiidsse järjestuse külge kinnitati Cy3-ga märgistatud DNA, mis PCR-i käigus toodetud produkti kinnitumisel oligonukleotiidsse kandjaga hakkab fluorestseeruma. Fluorestseerumise tuvastamiseks kasutati programmi GenePix 4000B, mis on võimeline skanneerima fluorestseeruva valguse tugevust ning analüüsima selle põhjal, milline oligonukleotiidsed järjestus ja proov ühinesid, tehes kindlaks, millise seeneliigiga võib tegu olla. 106-st kliinilisest proovist õnnestus tuvastada selle tehnoloogiaga 92% (Sato et al 2010).

Traditsioonilise PCR sooritamiseks kulub rohkem aega, kuid kindlasti üheks plussiks on selle meetodi odavus võrreldes näiteks RT-PCR (Gräser et al 2012). Iga uus tehnoloogia nõuab vastavat tehnikat, mille abil tehnoloogia läbi viiakse. Näiteks RT-PCR jaoks vajalike instrumentide soetamiseks kulub ligikaudu 65 000-150 000 dollarit (Schuller et al 2010). Loomulikult on hea, kui on võimalik kohe tuvastada liik, mis nakkuse põhjustas, kuid hetkel peavad siiski enamus meditsiinilistest asutustes arvestama sellega, et 80% on tegu liigiga *T. rubrum*, mida on võimalik tuvastada ka traditsioonilise PCR abil, ilma kallist tehnoloogiat

soetamata. Samuti on küsitav, kas on ikka vaja nii palju liike korraga tuvastada, kui tavaliselt on haiguse põhjustajaks sama liik.

5.4 PCR tulemuste analüüs

Traditsiooniliselt kasutatakse PCR tulemuse analüüsimiseks geelelektroforeesi, kus proovid märgistatakse etiidiumbromiidiga (Kondori et al 2010). Geelelektroforees on tänapäeval rutiinne meetod erineva suuruse ja laenguga makromolekulide eraldamiseks. DNA-molekulid on negatiivselt laetud ja liiguvad geelelektroforeesil „-“ elektroodilt (katoodilt) „+“ elektroodile (anoodile). Kuivõrd DNA-molekulidel on massist otseselt sõltuv konstantne laeng (iga nukleotiid sisaldab üht laetud fosforhappejääki), siis sõltub nukleiinhapete liikuvus agaros- ja polüakrüülamiidgeelis eelkõige nende suurusest. Need geelid on molekulaarseks sõelaks (ing. *molecular sieve*), kus suuremad fragmendid liiguvad aeglasemalt, väiksemad aga kiiremini. Nukleiinhappe suuruse määramiseks kantakse geelile alati teadaoleva pikkusega nukleiinhappe fragmente (suurusmarker), millega uuritavat DNA-d võrreldakse. Agarosgeeli värvimisel etiidiumbromiidiga (*ethidium bromide*, *EtBr*) läheb see interkaleeruv värvaine DNA kaksikheeliksi nukleotiidide vahele ning DNA-fragmente UV-valgusega valgustades on need geelis nähtavad roosalt või siniselt helendavate triipudena (Heinaru 2012). Olenevalt amplifitseeritud DNA suurusest tuleb valida ka geeli tüüp, mida kasutada. Kõige tavalisemalt kasutatakse agarosgeele, kuid DNA fragmentide jaoks, mille suurus jääb vahemikku 50-1000 bp, oleks soovituslik kasutada polüakrüülamiidgeeli. Geel, mis suudab lahutada kuni ühe nukleotiidi võrra erinevaid nukleiinhappe fragmente. Olenevalt viisist, kuidas vool läbib geeli, on välja töötatud mitmeid tehnoloogiaid. Pulseeriv geelelektroforees (*pulsed field electrophoresis*), mis võimaldab suurematel DNA fragmentidel liikuda geelis kaugemale, kui seda ainult ühesuunaline vool võimaldaks. Gradient geelelektroforeesi abil on võimalik eraldada fragmente, mis on lähedase suurusega (Clark & Pazdernik 2007).

Üheks PCR fragmentide analüüsi meetodiks on ka varem mainitud DNA sulamispunkti analüüs. Kõik PCR produktid sulavad erineval temperatuuril, kuna koosnevad erinevatest nukleotiididest. Selle analüüsi abil on võimalik kindlaks teha nii DNA produkti olemasolu antud proovis, kui ka selle kvaliteet. Erinevad, valesti hübridiseerunud ning mutantsed produktid sulavad erineval temperatuuril, andes nii märku võimalikust ebaspetsiifilisest PCR produktist. Lisaks saab määrata negatiivse proovi piirväärtuse, millest allpool võib vähesed DNA produkti korral lugeda proovi negatiivseks (Schuller et al 2010). Analüüs sellisel meetodil on kiirem, kuna tulemusi on võimalik näha arvutiekraanil graafikuna ning kindlasti turvalisem, kuna produktid on paremini eristatud. Etiidiumbromiidiga töötlemisel võib ka

võõr-DNA saada märgistatud, geelelektroforeesi puhul võib see visualiseeruda ning muuta PCR tulemused mitteusaldusväärseks.

Kõige uuenduslikum PCR-järgne tulemuste analüüs põhineb ka juba varem mainitud DNA mikrokiiptehnoloogial. Selle tehnoloogia abil on võimalik disainida väga palju erinevad kiipe, mille spetsiifilisus sõltub kiibile paigutatud oligonukleotiidsetest järjestustest. Ühele kiibile on võimalik disainida tuhandeid erinevaid järjestusi ning tänu erinevatele programmidele ja fluorestseeruvatele DNA järjestustele, mis lisatakse oligonukleotiidsetele järjestustele on andmeid analüüsida väga lihtne. Amplifitseeritud DNA hulk PCR-is on proportsionaalses suhtes fluorestseeruva signaali tugevusega (Campbell 2012). DNA mikrokiiptehnoloogias kasutatakse mitmeid erinevaid fluorestseeruvaid värvaineid ehk fluorofore, näiteks mitespetsiifilisi DNA kaksikheelikisi vahele minevaid fluorofore, spetsiifilisi PCR produkti värvimiseks mõeldud aineid ning oligonukleotiidsetele kandjatele kinnituvaid fluorofore. Kõigil neil on ühine omadus ühendada keemiliste ühendite fluorestseeruv omadus ning amplifitseeritud DNA hulk. Kõige sagedamini kasutatakse SYBR rohelist, mis on kõige lihtsam ja odavam värvaine, mille abil tuvastada tekkinud PCR produkti. See tuleb lisada PCR reaktsiooni segusse juba PCR alguses ning see seondub DNA kaksikheelikisi vahele, kus emiteerib 1000 korda suurema fluorestseeruva signaali, kui vabalt lahuses olles. SYBR roheline positiivsed küljed on selle odavus, tundlikkus ning kasutamise mugavus. Miinuseks on spetsiifilisuse puudumine, kuna ta seondub iga kaheaheelalise DNA-ga reaktsioonis, märkides ära ka niinimetatud vale-positiivsed tulemused. Kindlasti peab arvestama ka sellega, et suurtes kogustes on SYPR roheline toksiline Taq polümeraasile ja võib vähendada Taq polümeraasi võimet sünteesida suurtes kogustes PCR produkte. Teine viis tuvastada tekkinud PCR produkti on LUX (*light upon extension*), mis seondub spetsiifiliselt juba tekkinud PCR produktiga võimaldades analüüsida nii tekkinud PCR produktide hulka kui ka kvaliteeti (Schuller et al 2010). Kõige täpsemate tulemuste saamiseks kasutatakse värvimist kahe erineva fluoroflooriga. TaqmanR järjestusega märgistatud DNA proovis ja hübriidiseerunud proovis ei esine fluorestseerimist, sest kustutav fluorofloor surub koostoimes reporter-fluoroflooriga avaldumise maha. PCR-i käigus polümeraasi 5'-3'aktiivsus degradeerib proovi ja tulemusel vabaneb mõõdetav fluorestsents (Heinaru 2012).

5.5 DNA-põhiste ja MALDI TOF spektomeetriaal põhinevate identifitseerimismeetodite plussid ja miinused

Igal meditsiiniliste proovide uurimiseks kasutataval testil peaks olema määratud tundlikkus ja spetsiifilisus. Testi tundlikkus on tõenäosus, millega haige on testis tuvastatud kui positiivne

ja spetsiifilisus on tõenäosus, millega mittehaige on tuvastatud kui negatiivne. Meditsiinis kasutatavates testides on soovitatav spetsiifilisus ja tundlikkus vähemalt 95%. Lisaks peab välja arvutama ennustatava positiivse ja negatiivse väärtuse. Testi ennustav positiivne väärtus näitab, kui palju positiivse testi tulemusega haigetest on ka tegelikult haiged. Negatiivne ennustav väärtus peab kajastama inimesi, kellel arvati infektsioon olevat, kuid tulemus osutus negatiivseks. Ülevaates, kus võrreldi 11 erinevat DNA-põhist testpaneeli dermatofüütide määramiseks kliinilistest proovidest, (publitseeritud 2007 – 2010) oli positiivne ja negatiivne ennustav väärtus leitud ühele testile (Gräser et al 2012).

PCR tehnoloogia üks olulisemaid faktoreid on kindlasti praimerite disanimine. Dermatofüütide puhul on geneetiliste markerite leidmine praktikas oluliste liikide eristamiseks osutunud keeruliseks ning seda olukorda komplitseerib keerukas taksonoomia, mis tuleneb nende seente klonaalsest paljunemisest ja aktiivsest mikroevolutsioonist. Iga PCR reaktsiooni puhul võib praimeritel esineda valesti paardumist, mida Taq polümeraas ei suuda parandada. Selle tõttu peaks igas uurimustöös sooritama sisemise amplifikatsiooni kontrolli (*internal amplification controls*) ehk IAC. Enamasti sooritakse amplifikatsiooni kontroll paralleelselt juba teadaoleva prooviga (faagi DNA, viiruse DNA), mis peaks andma õige katse soorituse korral positiivse tulemuse. Kindlasti peab testil olema negatiivne kontroll, et välistada praimerite omavahelist hübriidiseerimist ning võõr-DNA amplifikatsiooni. Selleks peab oletatavaid spetsiifilisi primereid testima, amplifitseerides ka uuritavale liigile fülogeneetiliselt lähedase liigi DNA-d. Kui see õnnestub, siis pole kas praimerid piisavalt spetsiifilised selle liigi tuvastamiseks ja testis on oodata vale-positiivseid tulemusi. Vale-hübriidiseerumist lähedase liigi ja inimese DNA-ga uuriti ainult 25% aastatel 2007-2010 publitseeritud PCR-metoodikal põhinevates uurimuses. Sisemist kontrolli rakendati 5-s uuringus 11-st vaadeldud uuringust (Gräser et al 2012).

Ühe uurimuse piires peaks kasutama mitmeid erinevaid meetodeid sama materjali testimiseks ning võrdlema neid omavahel. Kui kasutati traditsioonilisi diagnostika meetodeid, siis võrreldi omavahel kultuuri ja mikroskoopia tulemusi. Enamikul juhtudel võrreldakse DNA-põhiseid testpaneeli külvimeetodi ja mikroskoopia kui „kuldse standardiga“. Tegelikult ei saa adekvaatselt võrrelda nii erinevaid tehnoloogiaid. PCR on mitmeid kordi tundlikum ning spetsiifilisem ning tuleks võrrelda erinevaid molekulaarseid tehnoloogiaid omavahel (Jensen & Arendrup 2012). Erinevate diagnostika meetodite võrdlemiseks võib kasutada LCA-analüüsi (*latent class analyse*), mida kasutatakse standardvõrdluse puudumisel. LCA analüüs hindab erinevate meetodite efektiivsust, tundlikkust ning spetsiifilisust. LCA analüüsiks peab sooritama vähemalt kolm eraldiseisvat katset (Bergman et al 2013).

Molekulaarse diagnostika testid disainitakse spetsiifiliselt tuvastamaks kindlaid organisme, erinevalt mikroskoopiast ja kultuurist, kus võidakse tuvastada ka ettearvamatuid patogeene. DNA-põhistel testidel on mitmeid eelised. Traditsiooniline PCR on kõige odavam molekulaarne tehnoloogia, mille abil saab kiirelt ning liigispetsiifiliselt sooritada analüüsi. Miinuseks võib lugeda vajadust sooritada tulemuste visualiseerimiseks geelelektroforees, mis suurendab saastumise riski. *Real Time* PCR tehnoloogia on kallis, kuid äärmiselt kiire, võimaldades määrata mitut liiki korraga. Suletud tuubi süsteemil on kontaminatsioonirisk väiksem. DNA mikrokiiptehnoloogia abil on võimalik saavutada väga suur liikide identifitseerimise arv, mis teatud juhtudel on kliinilises praktikas äärmiselt oluline (Jensen & Arendrup 2012).

MALDI-TOF tehnoloogia eeliseks on kiirus, näiteks maatriksisse sisestatud mikroorganismi saab määrata 1 tunni jooksul. Probleemiks hetkel on tulemuste varieeruvus sõltuvalt söötimest, matriitsist ning valkude eraldamise protsessidest, mille tulemusena tekivad spektomeetrias väikesed erinevused. Usaldusväärsuse tõstmiseks peaks sooritama korduvaid katseid (sama organismi määratakse mitmes korduses), et saada usaldusväärne tulemus. MALDI-TOF tehnoloogia võimaldab väga spetsiifilist mükoloogilise kultuuri identifitseerimist ilma professionaalse personalita (L'Olliver et al 2013).

6. Kokkuvõte

Enam ei saa pidada mikroskoopiat, mükoloogilist külvi ja seene fenotüübi määramist pindmiste seeninfektsioonide „kuldseks standardiks“, vaid pigem meetodiks, millele otsitakse võrdväärset alternatiivi. Järk-järgult on DNA-põhiseid ja proteoomi analüüsil põhinevad meetodid asendamas traditsioonilisi diagnostika meetodeid. Mikroskoopia võimaldab tuvastada kiiresti dermatofüüdi esinemise kliinilises proovis, kuid ei võimalda tuvastada liiki. Kultuuri kasvatamine on aeganõudev, tihtipeale valenegatiivset tulemust andev ning ilma professionaalse personalita raskesti teostatav. Tänapäeva meditsiiniline diagnostika Lääne-Euroopas ja USA-s liigub kindlasti kiiruse ja spetsiifilisuse suunas, kasutades tehnoloogilisi tippsaavutusi. Paljudes regioonides on probleemiks laboratoorsele diagnostikale kuluv rahaline ressurss, mis piirab uute tehnoloogiate kasutuselevõttu. Gräser (2008) juhib tähelepanu igapäevasele dilemmale meditsiinis - kas ravida väheseid patsiente kasutades parimaid diagnostilisi vahendeid ja ravivõimalusi või aidata suuremat hulka patsiente, mitte nii spetsiifiliste ja kvaliteetsete diagnostika- ja ravivõimalustega.

Molekulaarbioloogia kiire areng võimaldab dermatofüütide diagnostika probleemile läheneda mitmest erinevast vaatenurgast. Diagnostika väljatöötamisel on väga oluline teada eesmärgi, mida soovitakse saavutada. PCR tehnoloogia võimaldab tuvastada mitmeid perekondi või ka spetsiifilisi liike. Rakendades PCR-järgseid meetodeid on võimalik tuvastada paljud dermatofüüdid liigilisel tasandil, suurendada spetsiifilisust ning vähendades analüüsiks kuluvat aega. PCR-i kasutamisel on mitmeid probleeme, millest ülesaamiseks on töötatud välja erinevaid tehnoloogiaid. Tihtipeale peab ajakulu vähendamiseks loobuma suuremast spetsiifilisusest või vastupidi. Seetõttu on oluline teada, kas soovitakse luua tehnoloogia, mis leiab ülemaailmselt kasutust või pigem äärmiselt spetsiifilist tehnoloogiat, millel on kitsamad eesmärgid.

Olenevalt eesmärkidest on tänapäeval võimalik valida väga paljude erinevate tehnikate ja diagnostiliste testide vahel. Iga labor peab valikul arvestama piirkonnas levinud haigusvormide ja haigustekitajatega. Varasemad traditsioonilised tehnikad on jäämas tagaplaanile spetsiifilisuse puudumise ning ajakulu tõttu ning patogeeni DNA-l ja proteoomi määramisel põhinevad tehnoloogiad kerkivad esiplaanile kiiruse ning spetsiifilisuse tõttu.

Identification of dermatophytes by phenotypic characters *versus* DNA and proteome in clinical laboratory practice

Adele Puusalu

Summary

The species concept of dermatophytes should be scientifically defensible and practically useable. Nowadays the microscopic examination and culture is believed not to be a „gold standard“ for identification of superficial fungal pathogens like dermatophytes, anymore. There is high need for alternative methods that are more specific. Step by step DNA methods and proteome are replacing traditional diagnostic methods. Microscopic examination enables detect dermatophytes in clinical samples quickly, but do not identify pathogen in species level. Mycological cultures are time-consuming and the susceptibility of culture is low (due to false-negative results). Culture-based identification needs mycological expertise not available in every clinical laboratory. Medical diagnostics in developed countries is moving towards rapid and specific identification methods, using technological advantages. In many areas in a world only limited resources are available for clinical diagnostics of superficial fungal infections and traditional phenotype-based identification algorithm is in use. Gräser (2008) points out that in everyday medicine is facing to dilemma – one philosophy is to cure few patients with best technology for diagnostics and treatment or another to help so many patients as we can (by using diagnostic methods and treatment that are not so specific and high-quality).

Fast development of molecular biology enables to solve problems in diagnostic methods from different point of view. PCR technology enable identify several dermatophyte genera and also species. It is possible to identify many dermatophytes on same test panel. Increased specificity and reduced time for sample processing are advantages of post-PCR methods. But if the goal is higher specific, then there is a need to use more time for experiment and *vice versa*. Novel DNA based test panels should be focused to solve restricted clinical problem (clinical manifestation or clinical sample set). It is very important that the purpose of developing technology has to be clear. The purpose can be to create a technology, that will be used world wide or to create more expensive very specific technology. Every laboratory should choose technological solution according to epidemiological situation in their country. Traditional technologies stay behind and new technologies based on DNA diagnostics and proteomics are rising up.

Tänuavaldus

Sooviksin tänada oma juhendajat Helle Järve, kelle toetus ning abi olid bakalaureuse töö valmimisel asendamatud.

Kasutatud kirjandus

- Bergman, A., Heimer, D., Kondori, N., Enroth, H. 2013. Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR.- *Clinical Microbiology and Infection* 19: 205-211.
- Bergmans, A., M., C., Ent, van der M., Klaassen, A., Böhm, N., Andriesse, G., I., Wintermans, R., G., F. 2009. Evaluation of single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material.- *Clinical Microbiology and Infection* 16: 704-710.
- Brillowska-Dabrowska, A., Saunte, D., M., Arendrup, M., C. 2007. Five-Hour Diagnosis of Dermatophyte Nail Infections with Specific Detection of *Trichophyton rubrum*.- *Journal of Clinical Microbiology* 45: 1200-1204.
- Brillowska-Dabrowska, A., Swierkowska, A., Saunte, D., M., L., Arendrup, M., C. 2010. Diagnostic PCR tests for *Microsporum audouinii*, *M. canis* and *Trichophyton* infections.- *Medical Mycology* 48: 486-490.
- Burzykowski, T., Molenberghs, G., Abeck, D., Haneke, E., Hay, R., Katsambas, A., Roseeuw, D., van de Kerkhof, P., van Aelst, R., Marynissen, G. 2003. High prevalence of foot diseases in Europe: result of the Achilles Project.-*Mycoses* 46: 496-505.
- Baron, E., J., Chang, R., S., Howard, D., H., Miller, J., N., Turner, J., A. 1994. *Medical Microbiology A Short Course*.- A John Wiley & Sons Inc., United States of America
- Campbell, M., J. 2012. *DNA microarrays, synthesis and synthetic DNA*.-Noca science publishers Inc., New York.
- Clark, D.P., Pazdernik, N.J. 2009. *Biotechnology Applying the genetic revolution*.- Elsevier Academic Press, London.
- Ebihara, M., Makimura, K., Sato, K., Abe, S., Tsuboi, R. 2009. Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28 S ribosomal RNA gene sequences.- *British Journal of Dermatology* 161: 1038-1044.
- Fuller, L., C. 2009. Changing face of tinea capitis in Europe.- *Current opinion in Infectious Diseases* 22: 115-118.

- Gräser, Y., Fari, M., El., Vilgalys, R., Kuijpers, A., F., A., De Hoog, G., S., Presber, W., Tietz, H.-J. 1999. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region.- *Medical Mycology* 37: 105-114.
- Gräser, Y., Scott, J., Summerbell, R. 2008. The New Species concept in Dermatophytes- a Polyphasic Approach.- *Mycopathologia* 166: 239-256.
- Gräser, Y., Czaika, V., Ohst, T. 2012. Diagnostic PCR of dermatophytes-an overview.- *Journal of the German Society of Dermatology* 10: 721-725.
- Hannuksela, M., Karvonen, S., Reunala, T., Suhonen, R. 2003. Ihotaudit.-*Kustannus Oy Duodecim*, Soome.
- Heinaru, A. 2012. Geneetika õpik kõrgkoolile. – Tartu Ülikooli kirjastus, Tartu.
- Jensen, R., H., Arendrup, M., C. 2012. Molecular diagnosis of dermatophyte infections.- *Current Opinion in Infectious Diseases* 25: 126-134.
- Kawasaki, M., Anzawa, K., Ushingami, T., Kawanishi, J., Mochizuki, T. 2011. Multiple Gene Analyses are Necessary to Understand Accurate Phylogenetic Relationships among Trichophyton Species.- *Medical Mycology Journal* 52: 245-254.
- Kondori, N., Abrahamsson, A-L., Ataollahy, N., Wennerås, C. 2010. Comparison of a new commercial test, Dermatophyte-PCR kit, with conventional methods for rapid detection and identification of *Trichophyton rubrum* in nail specimens.-*Medical mycology* 48: 1005-1008.
- Kudinha, T., Kong, F., Johnson, J., R., Andrew, S., D., Anderson, P., Gilbert, G., L. 2012. Multiplex PCR-Based Reverse Line Blot Assay for Simultaneous Detection Of 22 Virulence Genes in Uropathogenic *Escherichia coli*.- *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1198-1202.
- Landlinger, C., Preuner, S., Willinger, B., Haberpursch, B., Racil, Z., Mayer, J., Lion, T. 2009. Species-Specific Identification of a Wide Range of Clinically Relevant Fungal Pathogens by Use of Luminex xMAP Technology.- *Journal of Clinical Microbiology* 49: 1063-1073.
- L'Olliver, C., Cassagne, C., Normand, A-C., Bouchara, J-P., Contet-Audonneau, N., Hendrickx, M., Fourquet, P., Coulibaly, O., Piarroux, R., Ranque, S. 2013. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory.- *Medical Mycology Early Online*: 1-8

- Luk, N., M., Hui, M., Cheng, T., S., Tang, L., S., Ho, K., M. 2012. Evaluation of PCR for the diagnosis of dermatophytes in nail specimens from patients with suspected onychomycosis.- *Clinical and Experimental Dermatology* 37: 230-234.
- Lutsar, I., Mikelsaar, M., Karki, T. 2007. Meditsiiniline mikrobioloogia: bakterioloogia ja mükoloogia II osa.-Tartu Ülikool Mikrobioloogia instituut, Tartu.
- Mers, W., G., Hay, R., J. 2005. Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections Medical Mycology tenth edition.- Edward Arnold Ltd, London
- Mims, C., Dockrell, H., M., Goering, R., V., Roitt, I., Wakelin, D., Zuckerman, M. 2004. Medical microbiology updated third edition.-Elsevier Limited, London
- Murray, P., R., Rosenthal, K., S., Pfaller, M., A. 2009. Medical microbiology sixth edition.- Mosby Elsevier, Philadelphia.
- Nenoff, P., Erhard, M., Simon, J., C., Muylowa, G., K., Herrmann, J., Rataj, W., Gräser, Y. 2013. MALDI-TOF mass spectrometry- a rapid method for the identification of dermatophyte species.- *Medical Mycology* 51: 17-24.
- Nuovo, G.J.1994. PCR in situ Hybridization Protocols and applications second edition.-Raven Press, New York.
- Rezaei-Matehkolaei, A., Makimura, K., De Hoog, G., S., Shidfar, M., R., Satoh, K., Najafzadeh, M., J., Mirhendi, H. 2012. Discrimination of *Trichophyton tonsurans* and *Trichophyton equinum* by PCR-RFLP and by β -tubulin and Translation Elongation Factor I- α sequencing.- *Medical Mycology Early Online*: 1-5.
- Richardson, M., D., Warnock, D., W. 1997. Fungal infections. Diagnosis and Management. 2nd Edition.-Blackwell Science Ltd.
- Sato, T., Takayanagi, A., Nagao, K., Tomatsu, N., Fukui, T., Kawaguchi, M., Kudoh, J., Amagai, M., Yamamoto, N., Shimizu, N. 2010. Simple PCR-Based DNA Microarray System To Identify Human Pathogenic Fungi in Skin.- *Journal of Clinical Microbiology* 48: 2357-2364.
- Schuller, M., Sloots, T., P., James, G., S., Halliday, C., L., Carter, I., W., J. 2010. PCR for Clinical Microbiology An Australian and International Perspective.- Springer
- Zhou, P., Altman, E., Perry, M., B., Li, J. 2010. Study of Matrix Additives for Sensitive Analysis of Lipid A by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry.- *Applied and Environmental Microbiology* 76: 3437-3443.

Zhu, Z., Jenkins, G., Zhang, W., Zhang, M., Guan, Z., Yang, C.J. 2012. Single-molecule emulsion PCR in microfluidic droplets.- *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403: 2127-2143.

Theel, E., S., Hall, L., Mandrekar, J., Wengenack, L. 2011. Dermatophyte Identification Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry.- *Journal of Clinical Microbiology* 49: 4067-4071.

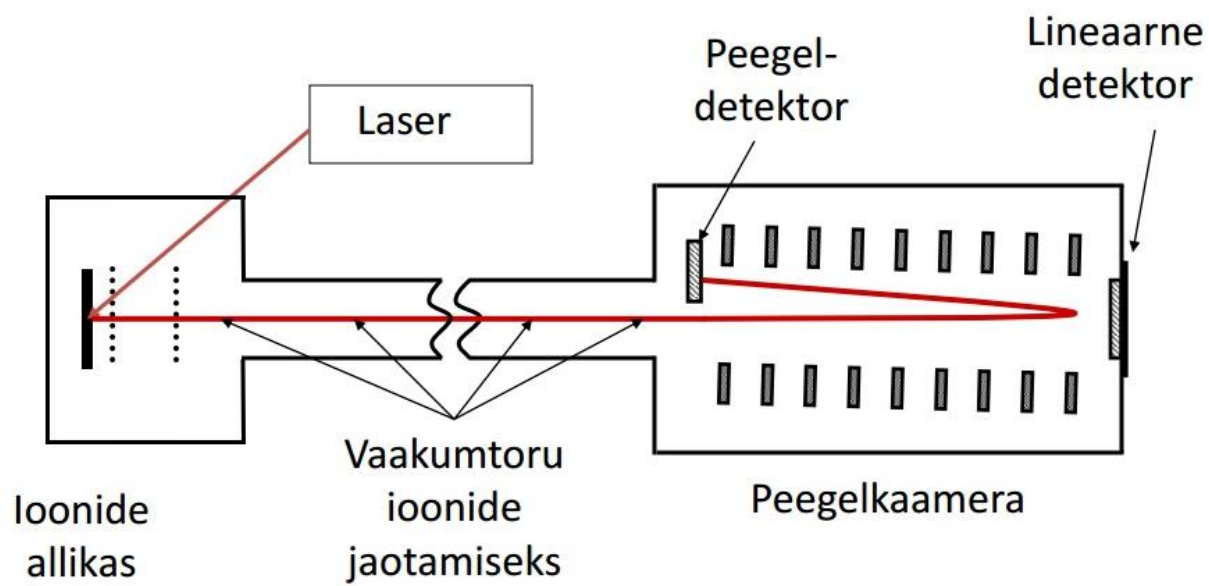
Watanabe, S., Harada, T., Hiruma, M., Iozumi, K., Katoh, T., Mochizuki, T., Naka, W. 2010. Epidemiological survey of foot diseases in Japan: Results of 30 000 foot checks by dermatologist.-*Journal of Dermatology* 37: 397-406.

Wisselink, G., J., Zaten, E. van., Kooistra-Smid, A., M., D. 2011. Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR.- *Journal of Microbiological Methods* 85: 62-66.

LISA

Lisa 1.

Joonis 1. Massispektromeetri ehitus skemaatiliselt



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Adele Puusalu

sünnikuupäev: (02.08.1990)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Fenotüüp *versus* DNA ja proteoomika dermatofüütide identifitseerimisel kliinilise labori praktikas

mille juhendaja on Helle Järv,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus/Tallinnas/Narvas/Pärnus/Viljandis, **27.05.2013**